

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月7日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590143

研究課題名（和文）レチノイドによる海産性巻貝類のインポセックス誘導機構

研究課題名（英文）Induction mechanism of imposex in marine gastropods by retinoids

研究代表者

西川 淳一（NISHIKAWA JUN-ICHI）

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：90218131

研究成果の概要（和文）：1960年代以降、有機スズ化合物は船底塗料や漁網の防汚剤として大量に使われ、海洋汚染の原因となってきた。水系の無脊椎動物、特に海産性の巻貝類は有機スズの影響を受けやすく、インポセックスと呼ばれる雌の雄化が起きる。この巻貝類における性の転換に、レチノイド X 受容体が関与しているとの説が有力となっている。しかし、無脊椎動物におけるレチノイドの作用についてはよく分かっておらず、本研究課題において、レチノイドのシグナル伝達に関与する遺伝子をクローニングし、比較生物学的な観点から検討した。

研究成果の概要（英文）：Organotin compounds have been widely used as antifouling paints for ships and fishing nets since the 1960s and have thus released into marine environments. Aquatic invertebrates, particularly marine gastropods, are extremely sensitive to organotin compounds such as tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT). So far, very low-concentration of TBT or TPT have been shown to induce imposex (superimposition of male genitalia on female) in marine gastropods. Although the imposex induction mechanism has been controversial for many years, we have reported that TBT and TPT are potent and efficacious activators of retinoid X receptor (RXR), and the natural ligand of RXR, 9-cis retinoic acid, induces imposex. However, in vertebrates, all-trans retinoic acid is well-known morphogen important for axial patterning and organ formation in early development. In this study, we analyze the molluscan receptor for all-trans retinoic acid in the view of the evolutionary history of retinoid machinery.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：環境化学

1. 研究開始当初の背景
遺伝子工学の進展に伴うパラダイムシフ

トにより、内分泌学の研究も「生理活性物質の同定」→「受容体タンパク質の精製」→「遺

伝子の同定」の流れが逆転しつつある。例えば、ある生物種において、ステロイドホルモンが存在しないことを完全に証明することは難しいが、ステロイドホルモンの生合成に関与する遺伝子の存在の有無は、全ゲノムが解読されている種に関しては比較的容易である。

これまでに、細菌からヒトに至まで、様々な種のゲノムプロジェクトが行われ、性ステロイドやレチノイドの生合成酵素やそれらの受容体に関しても多くのことが分かってきた。ステロイドホルモンの受容体や生合成酵素は、魚類から哺乳類にいたるまでよく保存されているが、無脊椎動物には一部の例外を除いて存在しない。頭索動物のナメクジウオや尾索動物のホヤは、終生もしくは少なくとも発生の初期に脊索を持ち、脊椎動物への進化を考える上で重要な位置にある。2002年にホヤの全ゲノムの概要配列が発表され、ホヤには17種類の核内受容体遺伝子があり、レチノイドの受容体は存在するが、ステロイドの受容体は無い。また、性ステロイドの生合成酵素をコードする遺伝子も揃っておらず、ホヤはアンドロゲンやエストロゲンを合成できないと考えられる。一方、より脊椎動物に近いナメクジウオにおいては、性ステロイド生合成酵素が揃って見つかっており、この辺りが進化系統樹上の境界と考えられる。

一方、脊椎動物の発生・分化に重要な役割を果たす全トランスレチノイン酸(atRA)は、ビタミンA(レチノール)をレチナルに酸化する酵素ADH(alcohol dehydrogenase)とレチナルを酸化してatRAにする酵素RALDH(retinaldehyde dehydrogenase)によって作られる。また、atRAの生体内濃度はatRAを分解する酵素CYP26により調節されている。これらatRAの生合成や代謝に関わる酵素群とレチノイン酸受容体(RAR)は脊椎動物全般にわたって保存されており、棘皮動物のウニにも存在する。しかし、RARは昆虫以下の下等生物には見つかっておらず、進化系統樹上の境界がどこにあるのか不明である。一方、atRAの異性体9-シスレチノイン酸(9-cis RA)をリガンドとするRXRはクラゲにも見つかっており、我々の研究によって貝類にも存在することが明らかとなっている。このように、無脊椎動物におけるレチノイドシグナルに関与する分子については解明途上であり、本研究課題において、鍵となる分子のRARについて検討した。

2. 研究の目的

近年話題となった内分泌攪乱物質問題において、船底塗料や魚網防汚剤などに使用されてきたTBTやTPTなどの有機スズ化合物が海産性巻貝類に作用し、ごく低濃度で雌を雄化(インボセックス)することが取り上げ

られた。多くの環境調査や実験室内での暴露実験から、TBTとTPTがインボセックスの原因物質であることに疑いの余地はないが、その作用機構に関しては長らく不明であった。これまで考えられてきたインボセックス誘導メカニズムには、①アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素のアロマターゼが阻害されアンドロゲンの体内濃度が高くなる、②アンドロゲンを対外に排泄するために必要な硫酸抱合が阻害されてアンドロゲン濃度が高くなる、③有機スズが神経毒として働きペニス形成因子の放出が過剰になる等があげられるが、いずれも決定的な証拠は得られていなかった。そのような中、我々は有機スズ化合物が核内受容体のRXRやPPARに非常に低濃度から結合することを見いだした(Kanayama T, et al, Mol. Pharmacol., 2005)。また、日本近海に棲息する巻貝のイボニシからのRXRのクローニングに成功し、イボニシRXRも有機スズ化合物と9-cis RAに高い親和性で結合することを証明した。さらに、9-cis RAを雌のイボニシに筋肉注射することにより、明瞭にペニス伸長が引き起こされ、輸精管が発達した(Nishikawa J, et al, Environ. Sci. Technol., 2004)。同様の現象が、ポルトガルのCastro等のグループによって、ヨーロッパチジミボラを用いた実験においても追認されている(Castro LF, et al, Aquat. Toxicol., 2007)。これらの実験結果は、いずれもインボセックス誘導へのRXRの関与を支持しており、軟体動物の巻貝類においては、エストロゲンやアンドロゲンといったステロイドではなく、レチノイドが性の分化に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。実際、軟体動物においては、ステロイドホルモンは存在せず、アンドロゲンを持たない生物種においてはレチノイドが男性ホルモンとして働く可能性は排除できない。そこで、本研究課題では、無脊椎動物におけるレチノイドの作用機構を解明することを目的に研究を行った。脊椎動物においては、atRAが胚発生初期の形態形成に重要な役割を果たしている。atRAのシグナル伝達にはRARが重要な役割を果たしているが、無脊椎動物においては確認されていない。そこで、軟体動物のイボニシからRAR相同遺伝子のクローニングを行い、その機能の解析や分子進化について検討した。

3. 研究の方法

(1) RAR 相同遺伝子のクローニング

茨城県ひたちなか市平磯で採取した雄のイボニシ(*Thais clevigera*)より精巣および消化腺を単離し、液体窒素により急速凍結したのち、-80℃で保存した。total RNAをAGPC法で抽出後、オリゴdTカラムでpoly(A)RNAを調整した。精製したmRNA

を鋳型とし、逆転写酵素で cDNA を合成後、PCR 法で増幅した。尚、プライマーは哺乳類、鳥類、両生類、魚類などの RAR のアミノ酸配列を比較し、相同性の高い配列を基に以下のように設計した。

5'-GTNCARAARAAYATGCARTAYAC-3'

5'-YYANGGDATRCANACRTTYTC-3'

RT-PCR により増幅したバンドを切り出し、ジデオキシ法により塩基配列を決定した。さらに、5'-RACE 法および 3'-RACE 法により、全長の RAR の配列を取得し、配列を決定した。最後に、遺伝情報処理ソフトウェア (GENETYC-MAC) を使い、GenBank に登録されている他の生物種の RAR と比較し、系統樹を作成した。

(2) リガンド結合試験

イボニシよりクローニングした RAR 相同遺伝子のリガンド結合ドメインを大腸菌での発現ベクター pGEX4T-1 に組み込んだ。これを大腸菌 BL21 に導入し、IPTG による誘導後、超音波破碎し、ここから Glutathione Sepharose 4B を用いて目的とするタンパク質を精製した。精製したタンパク質に ³H でラベルした atRA を終濃度 10 nM となるよう加えた。ここにラベルしていない atRA を終濃度 1~1000 nM となるよう加え、氷上で 1 時間インキュベートした。ヒドロキシアパタイトをタンパク質吸着剤として加え、リガンドが結合したタンパク質を分離し、液体シンチレーションカウンターを用いて固相の放射活性を測定した。

(3) 転写活性化試験

イボニシよりクローニングした全長の RAR 及び RXR を哺乳動物細胞での発現ベクターの pcDNA 及び pCruzA に組み込んだ。pcDNA-tcRAR 及び pCruzA-tcRXR をルシフェラーゼレポーター遺伝子と共に HepG2 細胞に導入後、リガンドを加え、発現誘導したルシフェラーゼ活性を測定した。

(4) ゲノムクローニング

-80°C で保存しておいたイボニシを破碎後、SDS を含む溶解緩衝液に懸濁した。ここに ProteinaseK を加え、55°C で一晩インキュベートし、タンパク質を分解した。フェノール抽出後、エタノール沈殿によりゲノム DNA を得た。これを鋳型とし、cDNA の配列を基に設計したプライマーを用い PCR を行った。増幅したバンドを切り出し、塩基配列を決定した。

4. 研究成果

(1) イボニシの RAR 相同遺伝子

PCR クローニングにより、イボニシから RAR に相同性の高い遺伝子が得られた。図 1 に決定した塩基配列と推定されるアミノ酸配列を示す。下線は、脊椎動物の RAR と特に相同性の高い部分である。前半部分は、

C₂C₂ タイプの zinc finger モチーフのシステイン (C) が位置的に完全に保存された DNA 結合ドメインであり、カルボキシ末端側には 12 個の α-ヘリックスからなるリガンド結合ドメインがある。

```

ATGGAATGAGGAAGGAAATCTGAAGAAATTCACCACTGGTCGGA
M E N E E G K S E E N S P V V G
GGACAAACCCACTACAACATAGAACAACAAAATGGTGGTTTTGTGGA
G Q T H Y N I E Q Q N G G F V G
TCTCACTGCTATGAACACTATTTATTTGCTCAAAAATCAGGATAT
S H S A Y E H Y L F A Q K S G Y
ATGTTACCAATAATCAGCAGCTTAAAAATCAAATGTATGATACTCAG
M L P N N Q Q L K N Q M Y D T Q
GGAATGTATGAGATGCAAGTCCGACTTCGATGTCAAATCCTAGTTTG
G M Y E M Q S P T S M S N P S L
TCCCCTCCCACCACCCCTCCAGAATCTACAAGCCATGTGTTGTC
S P S P P P P P R I Y K P C V V
TGTAGCGATAAATCATCAGGTATCATTATGGAGTCAGCTCTTGTA
C S D K S S G Y H Y G V S S C E
GGTTGCAAGGGCTTCTCAGACGACGGTTCAAAAAATATGCAATAC
G C K G F F R R S V Q K N M Q Y
ACATGTCATAAAGATAAAGAACTGTGTTATAAACAAGTTACAAGGAAC
T C H K D K N C V I N K V T R N
AGGTGTCAGTACTGTCGACTGCAAAAGTGTTCGCTTCAGGCATGTC
R C Q Y C R L Q K C F A S G M S
AAAGAAGCTGTAAGAAACGACAGGAATAAAAAAGAAAGAAACGACTGGA
K E A V R N D R N K K K R L E
TCAGTGTACAGTCTGAAGAACTCACCGAGGACGAAACATTGATGTTA
S V S Q S E E L T E D E H S M L
CAGGAAACTCGATGCACATCGAGAAACATTCAAAAAGCAGGAGAT
Q E I L D A H R E T F Q K D E D
CCTGAACCGTCAAGAGTCCAGAGATCAAGACTAATGGAGAGGAAGCA
P E P S R V P E I K T N G E E A
GAATCGTCAAAAATAAAGCAGGAGGATTAGACAAGGCCAAAAGTTGAA
E S S K I K Q E D L D K A K V E
AAGTTCATGTTGTGGGAAAAAGTACTGAATGTGCATCAAAAGGCATT
K V M L W E K V T E L S S K G I
ATAAAAATTTGGACTTTGCTAAAAAGTCCAGGTTTTGCAACTTTA
I K I V D F A K K V P G F A T L
TCTACTCTGATCAAAATACATTGTTAAAGGCAGGATGTTAGAAATA
S T S D Q I T L L K A A C L E I
ATGATATAAGGCTCAGTTCAGATATGACCCGAAAAAAGCTTATG
M I L R L S S R Y D P E K N V M
TGTTTTAATGGTGGTTAACAATTAGATCGTCAACAGTTACAAAATGGT
C F N G G L T L D R Q Q L K V Y
GGATTGCGTTTACATAACGGACTATATTTTCATTGCTTCATCTTTG
G F G S L T D T I F S F A S S L
AAATCCATGGATGTTGATGATTGGAGTACGCTGCTGCTGCTGTT
K S M D V D D L E Y A A L S A V
TGCTTGTAGTGGTATCGCTCAGGGTTAGAAGATCCAGGAAAAATA
C L V S G D R S G L E D P G K I
GAACAATTACAGGAACCTATTTAGAGGCATTAAAAACATTATGTCGC
E Q L Q E P I L E A L K H Y V R
TCACGGCGGAAAGAGTCACTCATGTATTGCAAAAATGATAATGAAA
S R R K E S P H V F A K M I M K
TTAACTGATCTCAGGCTATTAGTGTAAGGTGCTGAAAGAGTATTA
L T D L R S I S V K G A E R V L
CATTACGGTTAGAAATGCCAGATGAACGCCACCATAATTATCGAA
H L R L E M P D E L P P L I I E
ATGTTGGACAGAACAGAGAATGTGTGTATACCGTGA
M L D R T E N V C I P *

```

図 1 イボニシの RAR に相同性の高い遺伝子

ヒトの RAR α と比較すると、DNA 結合ドメインで 94%、リガンド結合ドメインで 64%のアミノ酸が一致していた。ヒト RAR に関しては、X 線構造解析により、atRA との結合に重要な

アミノ酸が分かっているが、それらはよく保存されていた。

次に、ヒト、マウス、ニワトリ、アフリカツメガエル、ホヤの RAR とのアミノ酸配列を比較することにより遺伝子系統樹を作成した。

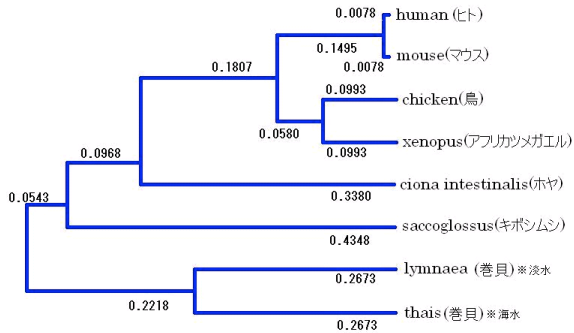


図 2 RAR 遺伝子の遺伝子系統樹

図 2 の数値は、アミノ酸置換数から推定した進化的な距離であるが、生物種の分岐順序とよく一致していた。また、貝類の RAR は脊索動物以上の RAR と別の分岐に存在することが分かる。

(2) 組換えタンパク質の発現とリガンド結合

イボニシの RAR 相同遺伝子にコードされているタンパク質が、実際に atRA と結合するかどうかを調べるために、リガンド結合領域を GST との融合タンパク質として、大腸菌で発現させた。

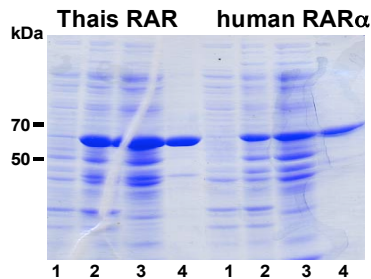


図 3 RAR の大腸菌での発現と精製
1:誘導前 2:誘導後 3:破碎後 4:精製

図 3 に SDS-PAGE 後、クーマーシ染色したタンパク質のパターンを示した。レーン 1 は IPTG で誘導する前、レーン 2 は IPTG 誘導後で 60 kDa 付近に予想された分子量のバンドが現れている。レーン 3 は大腸菌を超音波破碎後の遠心上清で、レーン 4 は GSH アフィニティーカラム後で、ほぼ単一バンドまで精製することができた。

そこで、次に atRA が組換えタンパク質に結合するかどうかを、³H 標識した atRA に対する競合的受容体結合試験で調べた。

図 4 の ■ がイボニシ由来の RAR 相同タンパク質、□ が陽性対照として用いたヒト RAR α の結果である。ヒト RAR α では、45000dpm

の結合が見られ、結合した ³H-atRA は非標識の atRA の添加により減少し、100 倍過剰でほぼバックグラウンドレベルまで放射活性が低下した。このことは、atRA はヒト RAR α に特異的に結合していることを示している。これに対し、イボニシ由来の RAR 相同タンパク質では ³H-atRA の結合は認められなかった。

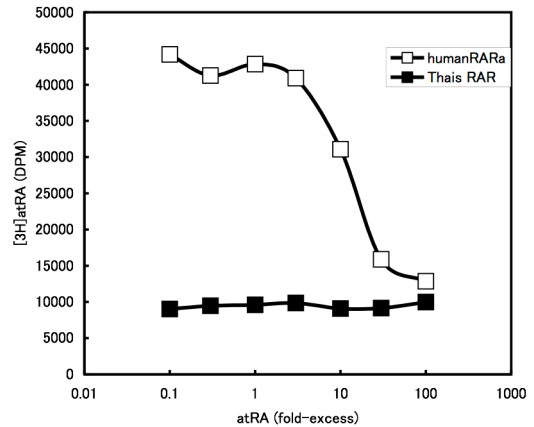


図 4 イボニシ RAR への atRA の結合性

(3) イボニシ RAR の転写活性化能

in vitro の結合試験では、大腸菌で発現させたタンパク質を使用するため、翻訳後修飾等が期待できず、コンフォメーション的に正常なタンパク質ではない可能性も否定できない。そこで、哺乳動物での発現ベクターを構築し、レポーター遺伝子試験により RAR の atRA 依存的な転写活性化能を調べた。

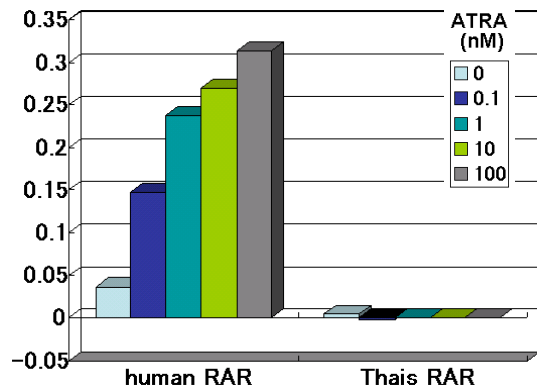


図 5 イボニシ RAR の転写活性化能

図 5 に示したように、陽性コントロールとして用いたヒト由来の RAR では、atRA の濃度依存的に転写活性の増大が認められた。しかし、イボニシの RAR 相同遺伝子では活性が全く認められず、構成的な転写活性化因子でもないと考えられた。

以上の結果より、イボニシには脊椎動物の RAR と一次構造上、非常に似たタンパク質が存在するが、リガンドは atRA ではないと考

えられた。

(4) イボニシ RAR のゲノム構成

RAR 遺伝子の分子進化を探るために、イボニシゲノム上の、RAR 遺伝子の構成を調べた。図 6 にヒト RAR のゲノム構成を示したが、コード配列 (エクソン) は長いイントロンによって分断されている。

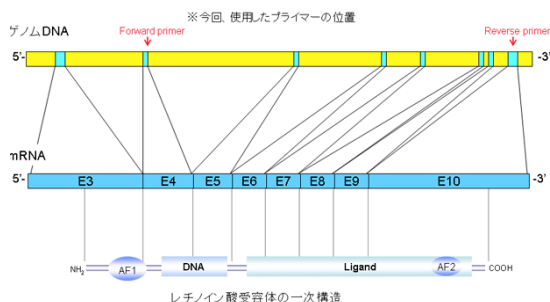


図 6 ヒト RAR のゲノム上での遺伝子の編成

今回、ヒト RAR のエクソン 4 とエクソン 10 に相当する位置にプライマーを設計し、イボニシのゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。

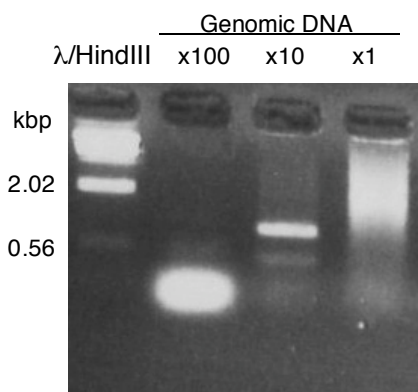


図 7 ゲノム PCR

鋳型 DNA の濃度を変化させて PCR を行ったところ、原液を 10 倍希釈した時のみに鮮明なバンドが検出された。アガロースゲル電気泳動より計算されたバンドの長さは約 1 kb であり、ヒト RAR のゲノム構成より推定される塩基対数 >30 kb より格段に短かった。そこで、PCR 産物の塩基配列を決定したところ、イントロンは含まれておらず、ヒト RAR のゲノム構成とは全く異なることが分かった。これらの事実より、RAR の分子進化は、脊椎動物と無脊椎動物で異なる経路を辿ってきており、レチノイン酸の生理作用も違うことが予想される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Moriya N, Kataoka H, Fujino H, Nishikawa J, Kugawa F. Effect of lipopoly saccharide on the xenobiotic induced expression and activity of hepatic cytochrome P450 in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 2012, 473-480 査読有
- ② Osada S, Kageyama K, Ohnishi Y, Nishikawa J, Nishihara T, Imagawa M. Inositol phosphate kinase Viplp interacts with histone chaperone Asflp in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Rep.* 39, 2012, 4989-4996 査読有
- ③ Okada Y, Nishikawa J, Semma M, Ichikawa A. Induction of integrin $\beta 3$ in PGE₂-stimulated adhesion of mastocytoma P-815 cells to the Arg-Gly-Asp-enriched fragment of fibronectin. *Biochem. Pharmacol.* 81, 2011, 866-872 査読有
- ④ Inoue D, Nakama K, Sawada K, Watanabe T, Takagi M, Sei K, Yang M, Hirotsuji J, Hu J, Nishikawa J, Nakanishi T, Ike M. Contamination with retinoic acid receptor agonists in two rivers in the Kinki region of Japan. *Water Res.* 44, 2010, 2409-2418 査読有
- ⑤ Terada T, Okamoto K, Nishikawa J, Miura T, Nishinaka T, Nishihara T. Site-directed mutagenesis of rat thioltransferase: effects of essential cysteine residues for the protection against oxidative stress. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 24, 2010, 60-65 査読有
- ⑥ Zhen H, Wu X, Hu J, Xiao Y, Yang M, Hirotsuji J, Nishikawa J, Nakanishi T, Ike M. Identification of retinoic acid receptor agonists in sewage treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* 43, 2009, 6611-6616 査読有
- ⑦ Hiromori Y, Nishikawa J, Yoshida I, Nagase H, Nakanishi T. Structure-dependent activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by ornotin compounds. *Chemical Biol. Interact.* 180, 2009, 238-244 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 淳一 (Nishikawa Jun-ichi)
武庫川女子大学・薬学部・教授
研究者番号：90218131